

JP7097333

Publication Title:

SUPER-MOLECULAR STRUCTURE-TYPE ASSEMBLY

Abstract:

Abstract of JP7097333

**PURPOSE:**To obtain the subject assembly as a hydrophobicized polysaccharide compound, capable of increasing the blood retention time of a cytokine and of efficiently delivering a cytokine to specific organs, by embedding a cytokine in a polysaccharide-sterol derivative as super-molecular structure-type carrier. **CONSTITUTION:**This super-molecular structure-type assembly useful as e.g. a sustained release pharmaceutical can be obtained by embedding a cytokine in a polysaccharide-sterol derivative. The polysaccharide-sterol derivative to be used is especially such as to be synthesized by binding a sterol, via a linker, to a polysaccharide. The linker is esp. pref. of formula  $(CH_2)_mCONH(CH_2)_nNHCO-O$  (m is 0 or 1; n is a positive integer), esp. CONH. The polysaccharide is pref. pullulan. The sterol is pref. cholesterol. The cytokine is pref. an interferon, esp. interferon-alpha. The sustained release pharmaceutical is preferably used as a percutaneous or intramuscular injection. The sustained release pharmaceutical is also useful as a hepatic lipotropic pharmaceutical containing a super-molecular structure-type assembly obtained by embedding a cytokine in a polysaccharide formed by binding a sterol to a recognition element saccharide. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

---

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

*This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Stroke of Color, Inc.*

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-97333

(43) 公開日 平成7年(1995)4月11日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	ADU			
	ABA			
	ADZ			

A 6 1 K 37/ 02 ADU

ABA

審査請求 未請求 請求項の数25 OL (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-326635

(22) 出願日 平成5年(1993)12月24日

(31) 優先権主張番号 特願平5-193644

(32) 優先日 平5(1993)8月4日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72) 発明者 砂本 順三

滋賀県草津市若草2丁目14番1号

(72) 発明者 秋吉 一成

京都府宇治市小倉町堀池25番2号 グラ

ン・ドムール宇治小倉101号

(72) 発明者 岩佐 進

京都府綴喜郡田辺町大住ヶ丘1丁目21番地  
の2

(72) 発明者 佐藤 純

兵庫県川西市清和台西1丁目5番地117号

(74) 代理人 弁理士 岩田 弘 (外5名)

(54) 【発明の名称】 超分子構造型集合体

(57) 【要約】

【目的】 サイトカインの薬効を安定的に効率よく発現させるドラッグデリバリーシステムを提供する。

【構成】 ステロールを結合させた多糖類にサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体。

【効果】 サイトカインの血中滞留時間を増大させ、また、速やかに標的臓器へ効率的に運搬される。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】ステロールを結合させた多糖類にサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体。

【請求項2】ステロールをリンカーを介して多糖類に結合させてなる請求項1記載の超分子構造型集合体。

【請求項3】リンカーが

$-(CH_2)_mCONH(CH_2)_nNH-CO-O-$

【式中、mは0または1を、nは任意の正の整数をそれぞれ示す】である請求項2記載の超分子構造型集合体。

【請求項4】多糖類を構成する糖単位における1級水酸基が式

$-O-(CH_2)_mCONH(CH_2)_nNH-CO-O-R$

【式中、Rはステロール残基を、mは0または1を、nは任意の正の整数をそれぞれ示す】で表される請求項1記載の超分子構造型集合体。

【請求項5】多糖類を構成する糖単位100個あたり、0.2~20個のステロールを結合させた多糖類である請求項1記載の超分子構造型集合体。

【請求項6】認識素子糖をさらに結合させた多糖類である請求項1記載の超分子構造型集合体。

【請求項7】認識素子糖をリンカーを介して多糖類に結合させてなる請求項6記載の超分子構造型集合体。

【請求項8】リンカーが式

$-CONH-$

である請求項7記載の超分子構造型集合体。

【請求項9】多糖類を構成する糖単位における1級水酸基が

$-O-CONH-X$

【式中、Xは認識素子糖残基を示す】で表される請求項6記載の超分子構造型集合体。

【請求項10】多糖類を構成する糖単位100個あたり、1~50個の認識素子糖を結合させた多糖類である請求項6記載の超分子構造型集合体。

【請求項11】多糖類がプルランである請求項1記載の超分子構造型集合体。

【請求項12】ステロールがコレステロールである請求項1記載の超分子構造型集合体。

【請求項13】サイトカインがインターフェロンである請求項1記載の超分子構造型集合体。

【請求項14】インターフェロンがインターフェロン $\alpha$ である請求項13記載の超分子構造型集合体。

【請求項15】サイトカインがインターロイキンである請求項1記載の超分子構造型集合体。

【請求項16】インターロイキンがインターロイキン-2である請求項15記載の超分子構造型集合体。

【請求項17】ステロールを結合させた多糖類とサイトカインとを水溶液中で共存させることを特徴とする請求項1記載の超分子構造型集合体の製造法。

【請求項18】(a)ステロールおよび認識素子糖とを

2

結合させた多糖類と(b)サイトカインとを水溶液中で共存させることを特徴とする請求項6記載の超分子構造型集合体の製造法。

【請求項19】ステロールを結合させた多糖類にサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体を含有してなる徐放性製剤。

【請求項20】皮下投与剤である請求項19記載の徐放性製剤。

【請求項21】筋肉内投与剤である請求項19記載の徐放性製剤。

【請求項22】サイトカインがインターロイキンである請求項19記載の徐放性製剤。

【請求項23】ステロールと認識素子糖とを結合させた多糖類にサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体を含有してなる肝指向性製剤。

【請求項24】認識素子糖がガラクトースである請求項23記載の肝指向性製剤。

【請求項25】サイトカインがインターフェロンである請求項23記載の肝指向性製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、徐放性製剤などとして有用な、多糖類-ステロール誘導体にサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体に関する。

【0002】

【従来の技術】生理活性物質はヒトないしは動物などの疾病の治療に有効であるが、一方で投与方法・投与量を誤ると疾病が治療できないばかりでなく、重篤な副作用を惹起することがある。また有用な生物活性を有しているにもかかわらず、各種溶媒に対する溶解性に難点があるため、臨床応用の困難な生理活性物質も数多く見出されている。従って、ヒトないしは動物などの疾病を治療する目的で生理活性物質を生体に投与する時、まず該生理活性物質を生体に投与可能な形態に剤型化し、次いで必要量を標的部に適当な時間だけ存在させることを考慮しなければならない。近年のバイオテクノロジーの発展に伴い、多くのサイトカインが単離精製され、また大量生産が可能となり、新しい医薬品の候補物質として期待を集めている。しかし、これらを実用化するためには、解決すべき問題が数多くあるが、たとえば、目的とするサイトカインの薬効を効果的に発現させるため、その徐放性の賦与された製剤の開発や標的とする生体組織に送達するシステム(Targeting Drug Delivery System)の開発がある。サイトカインの体内挙動を厳密に制御することは、治療効果増強と副作用軽減のための重要な課題であると考えられている。例えば、インターロイキン-2(以下、IL-2と略記することがある)は、活性化T細胞により産生されるサイトカインで、NK細胞・キラーT細胞・ヘルパーT細胞あるいはB細胞の分化・増殖を促進することにより細胞性免疫を増強する。

I L-2のこの免疫賦活作用は、癌・細菌またはウイルス感染・自己免疫疾患・免疫不全などに対する治療に有効であることが分かっている。しかしながら、I L-2は生物学的半減期が小さく、ヒトに投与した場合、血中からの消失半減期は6.9分と報告されている(M. Taotze et al.: J. Immunol., 135, 2865(1985))。これはI L-2が血漿以外の細胞外液にも広く分布するためと考えられている(C. Bindon et al.: Br. J. Cancer, 47, 123(1983))。このように、生体からの消失が早く分布容積の大きい薬物は、実際の治療に際して十分な作用を発揮しにくく、そのため大量投与を必要とする。I L-2の場合、発熱・悪寒・倦怠感、また好酸球の増多や顆粒球の減少、さらには食欲不振・嘔吐・下痢、ときに発疹・浮腫、また呼吸困難や肺水腫などの重篤な副作用を伴うことがある。このため、しばしば投薬の中止あるいは投与量の減少を実施しているのが現状である。

【0003】また例えば、サイトカインの一つである、インターフェロン(以下、I F Nと略記することがある)は抗ウイルス活性、細胞増殖抑制効果など多様な生物活性を有する蛋白質であり、この薬理効果を利用して、多くの疾患の治療に、特にB型、C型慢性活動性肝炎、腎癌の治療に用いられている。しかしながら、I F Nを生体に単に投与しても肝臓へはほとんど移行せず、しかも体内からの排泄が速やかであるために、肝臓中のI F Nを有効濃度で維持することは困難であった。したがって、肝疾患の治療を効果あるものにするためには、高い投与量と長期にわたる治療を必要とするが、副作用の危険が付きまとう。インターフェロンの肝炎における作用機構としては、例えば、C型慢性活動性肝炎におけるインターフェロン $\alpha$ 型の一つの作用機構が報告されている。インターフェロンがウイルスに感染した肝細胞に直接作用し、肝細胞内2', 5'オリゴアデニル酸合成酵素(2', 5' oligoadenylate synthetase; 2-5 A S)を活性化し2', 5'オリゴアデニル酸を産生させ、これがR N a s eを活性化させ、ウイルス由来のR N Aを分解し、蛋白の合成阻害によりC型ウイルスの増殖を抑制するというものである(Barson, S., Tex. Res. Bio. Med., Vol. 35, 1(1977))。現在、肝炎ウイルスにはA~Eまで5つの型が見出されているが、輸血後非A非B肝炎患者血清からその遺伝子を発見されたRNA型のC型肝炎ウイルス(H C V)には有効な治療法が無かった。C型肝炎は急性症状の発症に始まり、成人においては高率に慢性化する。この慢性肝炎の進行は緩徐ではあるが、自然治癒例はきわめて少なく長期化に伴い最終的には肝硬変や肝細胞癌へと不幸な転帰を辿る症例が多い。一方、インターフェロンが大量生産可能となり、しかもこれらの蛋白がH C Vと近縁のRNA型ウイルスに対してin vitroで抗ウイルス活性を示したのみならず(二宮 康行ら: 基礎と臨床, 19, 231(1985))、さらにはウイルス感染マウスにおいても感染防御効果を示し

たことから(M. Kramer et al.: J. Interferon Res., 3, 425(1983))、臨床でのC型肝炎に対する効果が期待された。実際に、組換え型インターフェロン $\alpha$ 及び $\beta$ はC型肝炎患者に対して優れた治療効果を示し(J. H. Hoofnagle et al.: N. Eng. J. Med., 315, 1575(1986))、ややもすれば消極的であった慢性肝炎の治療に対し積極的な取り組みが可能となり、現在では広く臨床使用されている(山中 正巳ら: 日内会誌, 79, 1037(1990)、荏司 貞志ら: 日消誌, 88, 706(1991))。

【0004】しかしながら、C型肝炎においてはインターフェロンの著効率は現在のところせいぜい40%程度で十分ではなく(S. Kakuma et al.: Am. J. Gastroenterology, 85, 655(1990)、肝炎研究グループ: 肝・胆・脾, 22, 491(1991))、特にウイルス量の多い症例、例えばH C V II型ゲノタイプの患者ではその著効率は20%以下である(K. Yoshioka et al.: Hepatology, 16, 293(1982))。従って、このような症例では投与量を増やしたり、あるいは投与期間を延長することによって著効率を改善することが考えられる。また慢性肝炎から肝硬変へ進展しつつある症例では、現行のインターフェロンの投与量及び投与期間では効果はほとんど期待できない。インターフェロンを静脈内、筋肉内あるいは皮下投与した時、標的臓器である肝臓へはほとんど移行せず、血中半減期も短いため相当の高用量を必要としているのが現状である。インターフェロンの副作用には、初期症状として発熱・頭痛・全身倦怠感を伴うインフルエンザ様症状や白血球・血小板の減少、さらには中期症状として微熱の継続・食欲不振・不眠・鬱傾向、また後期症状として脱毛・甲状腺の機能低下などが挙げられる。このため薬効発現に十分な量のインターフェロンを相当の期間にわたって投与すべき症例の患者においても、副作用の発現により投薬の中止あるいは投与量の軽減を要するを得ないのが現状であった。このようなI F N、I L-2などのサイトカインの性質を改善し、臨床治療に役立たせる目的で多くの試みが成されている。例えば、

(i) 全投与量を変えずに投与回数を増やしたり、あるいは点滴静注のように持続注入することにより、血中での作用時間を伸ばす(K. Ootsu et al.: Cancer Immunology Immunotherapy, 30, 71(1989))、(ii) 薬物と当該抗体との免疫複合体を作製して投与する(特公昭60-502104、特開平3-279335、T. Kurokawa et al.: Thromb. Haemostasis, 66, 684(1991)、J. Sato et al.: Biotherapy, 5, 1063(1991)、K. Okamoto et al.: Jpn. J. Cancer Res., 83, 761(1992))、また、(iii) リボソームを用いてサイトカインを包埋する[佐藤智典ら: Drug Delivery System, 4, 7(1989)]、などの方法が挙げられる。

【0005】しかしながら、例えば、(i)の方法では、全投与量が変わらないため副作用の軽減効果として多くを期待できなかったり、あるいは患者のコンプライアンスを得にくい症例が多いこと、(ii)の方法では、

抗体として多く用いられるマウスモノクローナル抗体の免疫原性が問題となる場合があること、(iii)の方法では、水難溶性あるいは不溶性の薬物の包埋も可能となるが、リボソームが生体内の細網内皮系の細胞、例えばマクロファージなどに食食されたり、あるいはリボソームそのものの安定性に未だに問題を有していること、などの欠点を有することから、サイトカインの体内動態の改善に有効な簡便な方法は十分に得られていないのが現状である。一方、特定の糖鎖構造が分子認識素子として利用され、特異細胞への指向性を賦与しうすることは、古くから知られている。すなわち、自然界には細胞表面受容体の認識に深く関わっている糖鎖が幾つも存在し、例えば、マクロファージと結合しうるガラクトース、マンノース、フコース、肝実質細胞に対するガラクトース、繊維芽細胞に対するマンノース-6-リン酸、白血病細胞に対するフコース、接着蛋白セレクチンを発現する活性化血管内皮細胞や血小板に対するシアリルルイス $\alpha$ あるいはシアリルルイス $a$ 、などが挙げられる。例えば、特開昭63-152393号公報には、糖鎖を有するポリエチレングリコール誘導体がサイトカイン類の修飾に用いることができ、この修飾蛋白質が生体内における持続性の向上、あるいは特定の細胞、組織への送達の向上のために使用できることを示唆している。また、特開平4-211099号公報は、薬剤を骨髄または脳に選択的に運搬させるための担体として有用なグリコシル-蛋白質誘導体を記載している。さらに、大坪らは、糖で修飾したある種の蛋白質が肝臓へ移行し、移行したその蛋白質が細胞内ライソゾーム中で消化されることを報告している (Drug Delivery System, Vol. 6, 13-17 (1991))。また、多糖類-コレステロール誘導体が、リボソームの多糖被覆剤として使用することによりリボソームを物理的に安定化させること (越智章ら: Drug Delivery System, 5, 261 (1990))、あるいは蛋白質および疎水性の高い化合物と相互作用してそれらを包埋すること (K. Akiyoshi et al.: Chem. Lett., 1263 (1991))、などが報告された。しかしながら、これら蛋白質をはじめとする薬物と疎水性化多糖との複合体における、薬物そのものの血中動態へ与える影響については何ら知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、徐放性や標的指向性の賦与された、多糖類-ステロール誘導体にサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体を提供する。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、サイトカインの薬効を効果的に発現させるため、それに徐放性や標的指向性を賦与することについて鋭意研究した結果、超分子構造型のキャリアとしての多糖類-ステロール誘導体にサイトカインを包埋して疎水性化多糖複合体を作

製することによって、サイトカインの血中滞留時間を増大せうることを見出した。さらに、該疎水性化多糖複合体によって、特定臓器へサイトカインを効率良く移行させることができることを見いだした。すなわち本発明は、

(1) ステロールを結合させた多糖類にサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体、

(2) ステロールをリンカーを介して多糖類に結合させてなる上記(1)記載の超分子構造型集合体、

10 (3) 認識素子糖をさらに結合させた多糖類である上記(1)記載の超分子構造型集合体、

(4) 認識素子糖をリンカーを介して多糖類に結合させてなる上記(3)記載の超分子構造型集合体、

(5) ステロールを結合させた多糖類とサイトカインとを水溶液中で共存させることを特徴とする上記(1)記載の超分子構造型集合体の製造法、

(6) ステロールと認識素子糖とを結合させた多糖類とサイトカインとを水溶液中で共存させることを特徴とする上記(3)記載の超分子構造型集合体の製造法、

20 (7) ステロールを結合させた多糖類にサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体を含有してなる徐放性製剤、および

(8) ステロールと認識素子糖とを結合させた多糖類にサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体を含有してなる肝指向性製剤である。

【0008】本発明におけるサイトカインとしては、例えばマクロファージを抗原で活性化して得るインターロイキン-1、抗原でT細胞を活性化することによって得られるインターロイキン-2、T細胞のうち特定のクローンで産生されるインターロイキン-3、T細胞によって産生されるインターロイキン-4、T細胞代替因子 (TRF) またはB細胞分化因子 (BCDF)、抗原特異的サブプレッサー因子 (TsF)、可溶性免疫反応抑制因子 (SIRF)、サブプレッサー誘導因子 (SIF)、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、B細胞より産生されるB細胞増殖因子 (BCGF)、B細胞分化促進因子 (BCDF)、B細胞増殖抑制因子 (SBF) あるいはB細胞やT細胞から産生されるといわれるマクロファージ活性化因子 (MAF)、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF)、白血球遊走阻止因子 (LIF)、マクロファージなどによって産生されるインターフェロン- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、単球コロニー刺激因子 (M-CSF)、線維芽細胞から産生されるインターフェロン- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) などがある。これらの他にはインターロイキン-5やインターロイキン-6などの他のインターロイキン類、マクロファージ走化性因子 (MCF) やリンパ球遊走因子 (LCF) などのような走化性因子、血管透過性因子 (VPF) などの炎症性リンホカイン、細胞障害性T細

胞から産生されるパーホリン、リンパ球由来のリンホトキシン (LT) などの殺腫瘍因子などもある。さらに、細胞成長因子でもよく、例えば、線維芽細胞、平滑筋細胞をおもな標的とする血小板由来細胞成長因子 (PDGF)、線維芽細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、上皮細胞、軟骨細胞をおもな標的とする上皮細胞成長因子 (EGF)、線維芽細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、上皮細胞をおもな標的とする線維芽細胞成長因子 (FGF)、神経細胞をおもな標的とする神経成長因子 (NGF)、軟骨細胞をおもな標的とする神経成長因子 (IGF-I および IGF-II)、赤血球を増殖させるエリスロポエチン、肝細胞の増殖を促進するヘパトロピン (HTP) や肝細胞増殖因子 (hHGF) などがある。

【0009】本発明におけるサイトカインとしては、上記に挙げたもののなかでも、特にインターフェロン (IFNと略称することがある) あるいはインターロイキン-2 (IL-2と略称することがある) が好ましい対象であり、IFNについては $\alpha$ 型、 $\beta$ 型、 $\gamma$ 型のいずれでもよいが、とりわけ $\alpha$ 型がより好まれる。該IFN- $\alpha$ としては、IFN- $\alpha$ 活性、例えば抗ウイルス活性を有するペプチド系物質であれば、特に限定されない。たとえば天然型IFN- $\alpha$ であっても、遺伝子工学的手法で得られたIFN- $\alpha$ でもよいが、遺伝子工学的手法で得られた組換え型IFN- $\alpha$  (rIFN- $\alpha$ ) が好対象である。遺伝子工学的手法で得られたIFN- $\alpha$ としては、例えばrIFN- $\alpha$ A, B, C, D, E, F, G, H, I, J (特開昭57-79897号公報、ヨーロッパ特許公開番号43980号公報) が挙げられる。該IFN- $\alpha$ としてはその活性を有する限り誘導体であってもよく、その例としては、N末端アミノ基が-COCH<sub>2</sub>OHまたは-COCH<sub>2</sub>OHでアシル化されているIFN- $\alpha$ A誘導体 (特開昭63-41500号公報) などが挙げられる。

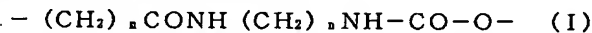
【0010】該IFN- $\gamma$ としては、IFN- $\gamma$ 活性、すなわち抗ウイルス活性を有するとともに免疫系を活性化するペプチド系物質であれば特に限定されない。たとえば天然型IFN- $\gamma$ であっても、遺伝子工学的手法で得られたIFN- $\gamma$ でもよいが、遺伝子工学的手法で得られたIFN- $\gamma$ が好対象である。遺伝子工学的手法で得られたIFN- $\gamma$ としては、例えば特開昭58-90514号公報に記載の方法で得られたもの、または特開昭59-186995号公報に記載の方法で得られたものなどが挙げられる。またIFN- $\gamma$ は、その活性を有する限り、その誘導体も含む。また該インターフェロンとしては、インターフェロンのアミノ酸組成の一部を、欠損または他のアミノ酸で置換させることにより変更したムテイン (mutein) でもよい。例えば、IFN- $\gamma$ の場合、アミノ末端および/またはカルボキシル末端から、1個もしくは数個のアミノ酸を欠くフラグメントが挙げられる。該フラグメントとしては、IFN- $\gamma$ のN

末端のCys<sup>1</sup>-Tyr<sup>2</sup>-Cys<sup>3</sup> およびC末端の130位のGlyないし146位のGlnのペプチド鎖においてそのC末端から数えて1~17個のアミノ酸もしくはペプチドを欠失したもの (特開昭60-202899号公報)、アミノ酸配列5-127、1-127または5-146からなるIFN- $\gamma$ の部分配列 (特開昭60-233100号公報)、IFN- $\gamma$ のN末端のCys-Tyr、Cys-Tyr-CysまたはCys-Tyr-Cys-GlnおよびC末端の131位のLysないし146位のGlnのペプチド鎖においてそのC末端から数えて1~16個のアミノ酸もしくはペプチドを欠失したもの (特開昭61-5096号公報)、アミノ酸配列1-131からなるIFN- $\gamma$ の部分配列 (特開昭61-63295号公報)、アミノ酸配列1-132または1-133からなるIFN- $\gamma$ の部分配列 (Arakawa et al., J. Biol. Chem. 261, 8534 (1986))、アミノ酸配列1-135からなるIFN- $\gamma$ の部分配列 (The Third Annual International Congress for Interferon Research)、IFN- $\gamma$ のN末端のCys<sup>1</sup>-Tyr<sup>2</sup>-Cys<sup>3</sup>-Gln<sup>4</sup>-Asp<sup>5</sup> およびC末端の128位のLysないし146位のGlnのペプチド鎖においてそのC末端から数えて0~19個のアミノ酸もしくはペプチドを欠失したもの (特開昭62-99399号公報) またはIFN- $\gamma$ のN末端のCys-Tyr-CysまたはCys-Tyr-Cys-GlnおよびC末端の122位のGluないし146位のGlnのペプチド鎖においてそのC末端から数えて18~25個のペプチドを欠失したもの (特開昭63-264500号公報) などが挙げられる。

【0011】該IL-2としては、IL-2と同様の活性を有するペプチド系物質であればよく、たとえばT細胞をその機能を維持したまま継代維持しうる作用を有する物質が挙げられる。具体的には、例えば特開昭61-78799号公報 (ヨーロッパ公開176,299号に相当) の第1図に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド (I) (ヒトIL-2) や、その生物学的もしくは免疫学的活性に必要な一部分のアミノ酸配列からなるフラグメントでもよい。上記フラグメントとしては、例えばポリペプチド (I) のアミノ末端から1個のアミノ酸 (EPC公開91539号公報) または4個のアミノ酸を欠くもの (特開昭60-126088号公報) やカルボキシル末端部の数個のアミノ酸を欠くものなどが挙げられる。さらに該ポリペプチド (I) の構成アミノ酸の一部が欠損しているか他のアミノ酸に置換されたもの、例えば125位のシステイン残基がセリン残基に置換されたもの (特開昭59-93093号公報および米国特許第4,518,584号) でもよい。とりわけ、本発明においては特開昭61-78799号公報の第1図に示されるアミノ酸配列を有するヒトIL-2を用いるのが好ましく、この場合そのアミノ末端にさらにメチオニン残基 (Met) を有するものと有さないものととの混合

物(特開昭60-115528号公報、特開昭61-78799号公報)であってもよく、またアミノ末端にMetを有さず、アラニン(Ala)で始まるもの(特開昭61-78799号)でもよい。また、糖鎖を有しているものであってもよい。

【0012】本発明におけるステロールとしては、例えば、コレステロール、スチグマステロール、 $\beta$ -シトステロール、ラノステロール、エルゴステロールなどが挙げられるが、好ましくは、コレステロールである。本発明におけるステロールを結合させた多糖類における多糖類としては、単糖残基が互いにグリコシド結合してできた高分子をいい、糖類成分は、単糖類(例、グルコース、マンノース、ガラクトース、フコース)から、または二糖類またはオリゴ糖類からも誘導できる。糖類単位\*



〔式中、mは0または1を、nは任意の正の整数をそれぞれ示す〕で表されるものが挙げられる。式(I)中のnとしては任意の整数でよいが、10以下が好ましく、さらに好ましくは2~6である。本発明におけるステロールを結合させた多糖類において、ステロールは、多糖類を構成する糖単位100個あたり、0.2~20個、好ましくは0.5~5個結合させるのが好ましい。本発明におけるステロールを結合させた多糖類としては、多糖類を構成する糖単位における1級水酸基が式  
 $-O-(CH_2)_mCONH(CH_2)_nNH-CO-O-R$

〔式中、Rはステロール残基を、mは0または1を、nは任意の正の整数をそれぞれ示す〕で表されるものがより好ましい。本発明におけるステロールを結合させた多糖類は、さらに認識素子糖を結合させていてもよい。本発明における認識素子糖とは、標的臓器、組織、細胞もしくは腫瘍(例、肝臓、細網内皮系組織・細胞、活性化血小板、白血病細胞、脳腫瘍)を認識し得るグリコシル基であり、例えば、マクロファージと結合しうるガラクトース、マンノース、フコース、肝実質細胞に対するガラクトース、繊維芽細胞に対するマンノース-6-リン酸、白血病細胞に対するフコース、接着蛋白セレクチンを発現する活性化血管内皮細胞や血小板に対するシアリルルイスxあるいはシアリルルイスa、などが挙げられる。

【0014】該グリコシル基の具体例としては、単糖類、オリゴ糖類が挙げられる。該グリコシル基としては、グリコフラノシル、グリコピラノシル、グリコセプタノシル基が挙げられるが、好ましくはグリコピラノシル基である。該単糖類としては、例えば、ガラクトピラノシル基、マンノピラノシル基、グルコピラノシル基、フコピラノシル基のアルドヘキソースからなる基、2-アミノ-2-デオキシガラクトピラノシル基、2-アミノ-2-デオキシマンノピラノシル基、2-アミノ-2-デオキシグルコピラノシル基、2-アミノ-2-デオ

\*は1, 2-, 1, 3-, 1, 4-または1, 6-グリコシド結合していてもよい。 $\alpha$ -または $\beta$ -型結合のいずれであってもよい。鎖は直鎖状でもまたは枝分かれしていてもよい。糖類成分はグルコースであるものが好ましい。該多糖類としては、例えば、天然または合成由来のプルラン、アミロベクチン、アミロース、デキストラン、ヒドロキシエチルデキストラン、マンナン、レバン、イヌリン、キチン、キトサンなどが挙げられるが、好ましくはプルランが使用される。

【0013】本発明において、ステロールはリンカーを介して多糖類に結合していてもよく、該リンカーとしては、ステロールを多糖類に結合させることができれば特に限定されないが、好ましくは、式(I)

キシフコピラノシル基のヘキソサミンからなる基、2-アセトアミド-2-デオキシガラクトピラノシル基、2-アセトアミド-2-デオキシマンノピラノシル基、2-アセトアミド-2-デオキシグルコピラノシル基、2-アセトアミド-2-デオキシフコピラノシル基のヘキソサミン誘導体からなる基が挙げられる。好ましくは、ガラクトピラノシル基、マンノピラノシル基、2-アセトアミド-2-デオキシガラクトピラノシル基、2-アセトアミド-2-デオキシマンノピラノシル基である。更に好ましくは、ガラクトピラノシル基、2-アセトアミド-2-デオキシガラクトピラノシル基である。該オリゴ糖類としては、構成単位としての単糖類を2ないし約10個有するものであり、かつその末端の構成単位の単糖類(非還元末端)として上記と同様な単糖類を有していればよく、該末端単糖類以外の構成単位としての単糖類はオリゴ糖類を形成できるものであれば特に限定されない。また、個々の単糖類間のグリコシド結合は $\alpha$ -,  $\beta$ -型のいずれであってもよい。ここで、オリゴ糖類からなるグリコシル基の末端の構成単位の単糖類とは、結合手とは反対側の構成単位の単糖類のことをいう。例えば、ガラクトピラノシル基を末端単糖類とするオリゴ糖類の場合、ガラクトピラノシル-グリコシル基であり、2-アセトアミド-2-デオキシガラクトピラノシル基を末端単糖類とするオリゴ糖類の場合、(2-アセトアミド-2-デオキシガラクトピラノシル)-グリコシル基である。なかでも、該オリゴ糖類としては、マンノピラノシル-マンノピラノシル基、(2-アセトアミド-2-デオキシマンノピラノシル)-マンノピラノシル基、(2-アセトアミド-2-デオキシグルコピラノシル)-マンノピラノシル基、フコピラノシル-(2-アセトアミド-2-デオキシグルコピラノシル)基、ガラクトピラノシル-(2-アセトアミド-2-デオキシグルコピラノシル)基、ガラクトピラノシル-(2-アセトアミド-2-デオキシマンノピラノシル)基、ガラクトピラノシル-グルコピラノシル基などの二



糖類またはジ(2-アセトアミド-2-デオキシグルコピラノシル)-マンノピラノシル基、ジ(ガラクトピラノシル)-2-アセトアミド-2-デオキシグルコピラノシル基などの三糖類が挙げられるが、さらに好ましくは、ガラクトピラノシル-グルコピラノシル基、ガラクトピラノシル-(2-アセトアミド-2-デオキシグルコピラノシル)基が挙げられる。

【0015】本発明において、認識素子糖はリンカーを介して多糖類に結合していてもよく、該リンカーとしては、認識素子糖を多糖類に結合させることができれば特

に限定されないが、好ましくは、式(II)

-CONH- (II)

で表されるものが挙げられる。本発明におけるステロールと認識素子糖とを結合させた多糖類において、認識素子糖は、多糖類を構成する糖単位100個あたり、1~50個、好ましくは1~30個、さらに好ましくは2~20個結合させるのが好ましい。本発明におけるステロールと認識素子糖とを結合させた多糖類において、認識素子糖を結合させた多糖類としては、多糖類を構成する糖単位における1級水酸基が式

-O-CONH-X

【式中、Xは認識素子糖残基を示す】で表されるものがより好ましい。

【0016】本発明におけるステロールと認識素子糖とを結合させた多糖類としては、多糖類を構成する糖単位100個あたり、0.5~5個の糖単位における1級水酸基が式

-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH-CO-O-R

【式中、Rはステロール残基を、mは0または1を、nは任意の正の整数をそれぞれ示す】で表され、かつ2~20個の糖単位における1級水酸基が

-O-CONH-X

【式中、Xは認識素子糖残基を示す】で表されるものがより好ましい。本発明におけるステロールを結合させた多糖類またはステロールと認識素子糖とを結合させた多糖類は、多糖類を出発物質として従来公知の方法により製造することができる。例えば、ステロールを多糖類に結合させ、ステロール-多糖類誘導体を作製した後、ステロール-多糖類誘導体に認識素子糖を結合させてもよいし、また認識素子糖を多糖類に結合させ、認識素子糖-多糖類誘導体を作製した後、認識素子糖-多糖類誘導体にステロールを結合させてもよい。さらに、ステロールと認識素子糖を多糖類に同時に結合させてもよい。ステロール-多糖類誘導体の合成方法としては、特開昭61-69801号公報に示されるように、多糖類とモノクロロ酢酸との反応によるカルボキシメチル化多糖類の合成(ステップ1)、カルボキシメチル化多糖類とエチレンジアミンとの反応によるN-(2-アミノエチル)カルバモイルメチル化多糖類の合成(ステップ2)、N

-(2-アミノエチル)カルバモイルメチル化多糖類とコレステリルクロホルメイトとの反応によるN-[2-コレステリルオキシカルボニルアミノ]エチル)カルバモイルメチル化多糖類の合成(ステップ3)の3ステップからなる方法、または、特開平3-292301号公報に示されるように、多糖類にステリル基を導入するに際し、アルカン類の一端α位にステリル基と他端ω位にイソシアネート基とをもつ化合物とを直接多糖類と反応させることを特徴とする(1ステップ)法などに準じた方法が挙げられる。認識素子糖-多糖類誘導体の合成方法としては、ガラクトサミンや1-アミノグルコースなどのアミノ糖を水溶性カルボジイミド縮合剤存在下でカルボキシメチル化多糖に導入する方法、あるいは上記のアミノ糖やアミノエチル化糖をパラニトロフェニル基を導入して活性化した疎水性化多糖に反応させる方法などが挙げられる。

【0017】一例を挙げれば、コレステロールをヘキシルジイソシアネートと反応させコレステリル-N-(6-イソシアネートヘキシル)カーバメートを合成し、ブルランに添加することにより疎水性化多糖を作製する

[K.Akiyoshi et al.: Chem.Lett., 1263 (1991)]。次いで、パラニトロフェニルクロホルメイトと反応させることでパラニトロフェニル基の導入された活性化された疎水性化多糖を取得し、最後にアミノエチル化糖と反応させ糖鎖を導入する(森口信弘ら:日本化学会第60秋季年会予稿集, II, 463 (1990))。本発明のステロールを結合させた多糖類またはステロールと認識素子糖とを結合させた多糖類にサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体は、次のように製造される。すなわち、本発明におけるステロールを結合させた多糖類(疎水性化多糖誘導体)またはステロールと認識素子糖とを結合させた多糖類(糖鎖修飾疎水性化多糖誘導体)は、水溶液中で安定な自己集合体を形成するが、意外にもこの時サイトカインが共存すればこれとも強く相互作用しこれを安定に包埋し、サイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体が製造される。ここで、包埋とは、サイトカイン分子が非共有結合的に複数の多糖分子あるいはステロール分子と相互作用してその分子集合体内に包まれる、あるいはその分子集合体とからまる状態を指す。包埋条件としては、室温(約4~40℃)で水溶液中、約0.5~48時間、好ましくは2~3時間のインキュベーションで十分である。水溶液としては、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液などの緩衝液が好ましく、また、反応のpHは約3~9、好ましくは6~8である。このとき、0.3~5分間程度の軽い超音波処理を与えてやると、より短時間で作製が可能となる。このように非常に緩やかな条件で包埋体を合成できるため、生物活性に微妙な影響を及ぼすサイトカインの高次構造に何らの変化も与えず、生物活性を安定に保持することができる。さらには、水難溶性のサイ



トカインを包埋することも可能である。本発明のサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体は、薬学的に許容される担体、希釈剤などを用いて、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの固形製剤、またはシロップ剤、注射剤などの液状製剤として、安全に使用することができ、経口的または非経口的（皮下、静脈内、筋肉内または直腸内）に哺乳動物（例、サル、イヌ、ブタ、ウサギ、マウス、ラット、ヒト）に投与することができる。

【0018】薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。賦形剤の好適な例としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが挙げられる。滑沢剤の好適な例としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。結合剤の好適な例としては、例えば結合セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。崩壊剤の好適な例としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウムなどが挙げられる。溶剤の好適な例としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが挙げられる。溶解補助剤の好適な例としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。懸濁化剤の好適な例としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシアセチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが挙げられる。等張化剤の好適な例としては、例えば塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。緩衝剤の好適な例としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。無痛化剤の好適な例としては、例えばベンジルアルコールなどが挙げられる。防腐剤の好適な例と

しては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。抗酸化剤の好適な例としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

【0019】本発明のサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体は、サイトカインを生体内において化学的および生物学的に安定に保ち、持続的に作用し、病巣指向的な性質を賦与することが可能である。例えば、超分子構造型集合体は、皮下投与された時、血中で緩やかに該集合体からサイトカインを放出することから、サイトカインの血中濃度を長時間にわたって保持することができる。したがって、本発明によると、サイトカインの薬効を持続させる徐放型の製剤を得ることができ、低用量でサイトカインの効果的な治療が可能である。また、本発明のサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体は、サイトカインを生体内において化学的および生物学的に安定に保ち、かつ標的臓器へ効率よく集積させる。例えば、本発明のサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体は、肝臓へ速やかに移行するという特徴を有するものである。さらに、本発明のサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体は、サイトカイン分子そのものを直接に何ら修飾していないので、サイトカイン本来の生物活性に何ら影響を与えるものではないものである。

【0020】本発明のサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体は、持続的にサイトカインの薬効を発現させることができ、また標的臓器に効率的に運搬されるので、低用量で治療効果をあげることができる。このため、発熱、悪寒などの副作用が少なく、しかも低毒性であるので、公知のサイトカインと同様の目的に、同様な方法で、より安全に使用することができる。例えば、本発明のリコンビナントインターフェロン- $\alpha$  (rIFN- $\alpha$ ) を包埋させてなる超分子構造型集合体は、抗腫瘍または抗ウイルス治療のための医薬として用いられ、その場合、rIFN- $\alpha$  の量として、約  $(0.1 \sim 1.0) \times 10^6$  単位/日で患者に注射投与し得る。本発明のリコンビナントインターロイキン-2 (rIL-2) を包埋させてなる超分子構造型集合体は、抗腫瘍または抗ウイルス治療のための医薬として用いられ、その場合、rIL-2 の量として、約  $0.1 \sim 10 \text{ mg}$ /日で患者に注射投与し得る。また、例えば、本発明のリコンビナントインターフェロン- $\gamma$  (rIFN- $\gamma$ ) を包埋させてなる超分子構造型集合体は、抗ウイルス、抗腫瘍作用、細胞増殖抑制、免疫増強のための医薬として用いられ、その場合、rIFN- $\gamma$  の量として、成人1日あたり10万ないし1億ユニットを静注または筋注などにより投与される。

【0021】

【実施例】以下に実施例、実験例および製剤例を挙げ

て、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例1. プルラン-コレステロール誘導体の合成

##### (1) コレステリル N-(6-イソシアネートヘキシル)カーバメートの合成

500ml容のナスフラスコにトルエン100ml、ピリジン4ml、1,6-ジイソシアネートヘキサン48ml (300mmol) を添加し、室温で攪拌した。この混液に、予めトルエン100mlに溶解したコレステロール7.80g (20mmol) を攪拌しながら徐々に加え、80℃に加熱し48時間反応させた。反応は、薄層クロマトグラフィー(固定相: シリカゲル、展開溶媒: クロロホルム、発色試薬: ヨード蒸気)で未反応のコレステロール ( $R_f=0.23$ ) が検出されなくなるまで続けた。反応終了後、トルエンおよび未反応の1,6-ジイソシアネートヘキサンを減圧除去し、次いで600mlの石油エーテルを添加して冷凍庫にて再沈させた。最初に析出する黄色オイル状の不純物を除去し、再び石油エーテルにて再沈させた。この操作を2回繰り返して得られた白色沈澱を濾別し、一夜30℃で真空乾燥させた。収量4.97g、収率44%。

赤外吸収スペクトル:  $\nu$  (N-H),  $3260\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  (N=C=O),  $2320\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  (C=O),  $1680\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  (C-O-C),  $1240, 1130\text{cm}^{-1}$

元素分析: 元 素	測定値	計算値
C	75.49%	75.76%
N	5.28%	5.05%

##### 【0022】(2) プルラン-コレステロール誘導体 (CHP) の合成

300ml容のナスフラスコに、100mlのジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解したプルラン4.0gを入れ、さらに予め8mlのピリジンに溶解したコレステリル N-(6-イソシアネートヘキシル)カーバメート0.34g (0.62mmol) を攪拌しながら加え、80℃で8時間反応させた。反応は、薄層クロマトグラフィー(固定相: シリカゲル、展開溶媒: クロロホルム、発色試薬: ヨード蒸気)で未反応のコレステリル N-(6-イソシアネートヘキシル)カーバメート ( $R_f=0.50$ ) が検出されなくなるまで続けた。反応溶液に500mlのエタノールを添加し5℃で一夜再沈させ、得られた沈澱を濾別し、2時間30℃で真空乾燥後シームレスセルロース膜 (VISCASE SALES Corp.) を用いて透析により精製した。透析終了後さらに凍結乾燥し白色の粉体を取得した。収量3.81g、収率90%。コレステロール基の置換度を $^1\text{H-NMR}$ および元素分析の結果から決定したところ、100単糖当たり1.7残基のコレステロールが導入された (CHP-50-1.7)。ここで、プルラン-コレステロール誘導体をCHP-X-Y (Xはプルラン部位の重量平均分子量(1000単位)を、Yはプルランの100単糖あたりのコレステロール残基の置換度をそれぞれ示す)で表した。すなわち、CHP-50-1.7とは分子量5万のプルラン(P)に100単糖あたり1.7個のコレステロール基が結合していることを

示す。

赤外吸収スペクトル:  $\nu$  (O-H),  $3400\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  (C=O),  $2850\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  (C-O-C),  $1100\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  (C-N),  $1000\text{cm}^{-1}$

元素分析: 元 素	測定値	計算値
C	41.97%	46.17%
N	0.25%	0.28%

##### 【0023】実施例2. プルラン-コレステロール誘導体のラクトース修飾

##### 10 (1) 活性化プルラン-コレステロール誘導体の合成

実施例1(2)で取得したCHPはそれ自体では反応性が低いため、パラ-ニトロフェニルクロロホルメート活性化法を用いて活性化CHPを合成した。CHP 501mgと4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) 24mg (196 $\mu\text{mol}$ ) とをDMSO/ピリジンの1:1混合溶媒24mlに攪拌溶解させて氷水中で0℃にし、さらに593mg (2.94mmol) のパラ-ニトロフェニルクロロホルメートを添加して3時間反応させた。150mlのエタノールで再沈し、ガラスフィルターにより減圧濾過して乾燥エタノールで洗浄した。得られた沈澱を直ちに2時間30℃で減圧乾燥することにより白色粉末を取得した。収量594mg、収率100%。パラ-ニトロフェニル基の置換度は、上記生成物を0.5N NaOH水溶液で加水分解後、遊離したパラ-ニトロフェノールを紫外吸収強度により決定した。導入率は100単糖当たり18.3個であった。

赤外吸収スペクトル:  $\nu$  (C=O),  $1765\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  ( $\text{NO}_2$  対称伸縮),  $1526\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  (ベンゼン環の骨格振動),  $1491\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$  ( $\text{NO}_2$  対称伸縮),  $1350\text{cm}^{-1}$

##### 30 【0024】(2) アミノエチルラクトース化プルラン-コレステロール誘導体の合成

上記のパラ-ニトロフェニル基を導入したCHP 150mgをDMSO/ピリジンの1:1混合溶媒20mlに溶解し、さらにDMAP 9mg (45 $\mu\text{mol}$ ) と $\alpha$ -ヘプタアセチルラクトシルエタノールアミン181mg (267 $\mu\text{mol}$ ) とを添加して2日間反応させた。減圧蒸留して溶媒を濃縮後、乾燥エタノール100mlを用いて再沈(3日間)させた。ガラスフィルターにより濾過洗浄後、3時間30℃で減圧乾燥した。得られた生成物は主鎖のプルランが炭酸結合により架橋されているので、これを切断するために0.01N NaOH水溶液でpHを12に保ちながら完全溶解させ、次いですばやく1N HCl水溶液で中和後、透析した。凍結乾燥により白色粉末が得られたが、さらにセファクリルS-300カラムを用いて精製した。収量127mg、収率72%。アミノエチルラクトースの導入率は100単糖当たり16.9個であった。

元素分析: 元 素	測定値
C	36.75%
H	5.92%
N	0.93%

アミノエチルラクトース化プルラン-コレステロール誘導体の合成経路は〔図1〕および〔図2〕に示した通り

であった。

【0025】実施例3. ブラン-コレステロール誘導体のガラクトース修飾

100ml容のナスフラスコに乾燥DMSO/ピリジン1:1混液30mlを添加し、次いで実施例2(1)で取得した活性化CHP 567mgを加えて攪拌溶解した。この溶液に23mgのパラジメチルアミノピリジン(DMAPアシル化触媒)と355mgのテトラ-O-アセチルガラクトシルエタノールアミン(活性基に対して1:2のモル比)とを加え、25℃で24時間反応させた。反応溶液を150mlのエタノールに加えて5℃で一晩再沈させたのち、得られた沈澱をガラスフィルターを用いて減圧濾過し一晩30℃で減圧乾燥した。得られた生成物に水酸化ナトリウム溶液を添加し、pH 12に保ちながら25℃で6時間攪拌して粉体を溶解した。1N塩酸溶液で中和後、透析・凍結乾燥することにより白色粉体を得た。赤外線スペクトルにより、アセチル基および炭酸結合が含有されないことを確認した。さらにセファクリルS-300カラム(2.6×90cm)を用いて精製後、凍結乾燥した。1-アミノガラクトースの導入および置換度は<sup>1</sup>H-NMRおよび元素分析により決定し、100単糖当り13個導入されていることが判明した。収量287mg、収率42%(CHP換算)。

【0026】実施例4. ブラン-コレステロール誘導体によるIFN $\alpha$ Aの包埋

実施例1で作製したブラン-コレステロール誘導体をPBSに溶解し(5 mg/ml)、等容量のIFN $\alpha$ A/PBS溶液(0.2 mg/ml)に添加した。次いで室温で12時間インキュベーションすることによりブラン-コレステロール誘導体によるIFN $\alpha$ Aの包埋体を作製した。

【0027】実施例5. ブラン-コレステロール誘導体によるIL-2の包埋

実施例1で作製したブラン-コレステロール誘導体をPBSに溶解し(5 mg/ml)、等容量のIL-2/PBS溶液(0.2 mg/ml)に添加した。次いで室温で12時間インキュベーションすることによりブラン-コレステロール誘導体によるIL-2の包埋体を作製した。

【0028】実施例6.

ラクトース修飾ブラン-コレステロール誘導体によるIFN $\alpha$ の包埋(I)

実施例2(2)で取得したラクトース修飾ブラン-コレステロール誘導体をリン酸食塩緩衝液(PBS;pH7.4)に溶解し(5.0mg/ml)、0.1mg/mlのIFN $\alpha$ (武田薬品(株)製)溶液に添加した。室温で3時間インキュベーションしたのち、セファクリルS-300カラム(ファルマシア製)を用いるゲル濾過クロマトグラフィーに供し精製した。溶離液はPBS、検出はIFN $\alpha$ をフルオレスカミン法、ブランを硫酸/フェノール法により実施した。得られた結果は〔図3〕および〔図4〕に示した通りであった。これらの結果から、上記の反応により、IFN $\alpha$ がラクトース修飾ブラン-コレステロール誘導体に包埋

されることが分かった。また、IFN $\alpha$ はその83%がラクトース修飾疎水性化ブランに包埋された。

【0029】実施例7.

ラクトース修飾ブラン-コレステロール誘導体によるIFN $\alpha$ の包埋(II)

実施例2(2)で取得したラクトース修飾ブラン-コレステロール誘導体をリン酸食塩緩衝液(PBS;pH7.4)に溶解し(7.5mg/ml)、80 $\mu$ g/mlのIFN $\alpha$ 溶液に添加した。室温で3時間インキュベーションしたのち、セファクリルS-300カラムを用いるゲル濾過クロマトグラフィーに供した。溶離液はPBS、検出はIFN $\alpha$ をフルオレスカミン法、ブランを硫酸/フェノール法により実施した。上記の反応条件下ではIFN $\alpha$ はその87%がラクトース修飾疎水性化ブランに包埋されることが分かった。

【0030】実験例1. IFN $\alpha$ Aを包埋させてなる超分子構造型集合体の徐放性

実施例4で作製したIFN $\alpha$ Aのブラン-コレステロール誘導体包埋体を6週齢雄性ラットへ皮下投与した(IFN $\alpha$ Aとして100 $\mu$ g/ラット)。コントロール実験として、IFN $\alpha$ A/PBS溶液をIFN $\alpha$ Aとして同量ラットに投与した。血中IFN $\alpha$ A濃度は公知の酵素免疫学的測定法(特願平5-117382号)により定量した。結果は〔図5〕に示した通りであった。IFN $\alpha$ A溶液投与の時、1時間で最高血中濃度が得られ、その後急速に血中から消失した。一方IFN $\alpha$ A包埋体投与の時、3時間で最高血中濃度が得られ、その後緩やかに血中から消失した。ファルマコキネティカルな解析結果から、平均血中滞留時間は溶液投与の約2.5~2.7倍であった。

【0031】実験例2. IL-2を包埋させてなる超分子構造型集合体の徐放性

実施例5で作製したIL-2のブラン-コレステロール誘導体包埋体を6週齢雄性ラットへ皮下投与した(IL-2として100 $\mu$ g/ラット)。コントロール実験として、IL-2/PBS溶液をIL-2として同量ラットに投与した。血中IL-2濃度は公知の酵素免疫学的測定法(J. Immunoassay, 8, 131(1987))により定量した。結果は〔図6〕に示した通りであった。IL-2溶液投与の時、30分で最高血中濃度が得られ、その後急速に血中から消失した。一方IL-2包埋体投与の時、3時間で最高血中濃度が得られ、その後緩やかに血中から消失した。ファルマコキネティカルな解析結果から、平均血中滞留時間は溶液投与の約3.0~3.4倍であった。

【0032】実験例3. サイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体の肝臓蓄積性

実施例2(2)で取得した糖鎖修飾ブラン-コレステロール誘導体をリン酸食塩緩衝液(PBS;pH7.4)に溶解し(5.0mg/ml)、0.2mg/mlのIFN $\alpha$ 溶液に添加した。25℃で4時間インキュベーションし、IFN $\alpha$ を包埋させてなる超分子構造型集合体溶液(糖鎖修飾超分子構造型IFN $\alpha$ 溶液)を得た。次いで、IFN $\alpha$ 溶液もしくは上記の糖鎖修

飾超分子構造型IFN $\alpha$ 溶液をラットへ静脈内投与し(10 $\mu$ g/ラット)、5分および10分後の血清中濃度、60分後の肝臓内濃度を公知の酵素免疫学的測定法(特願平5-117382号)により定量した。結果は[表1]に示した通りであった。本発明の糖鎖修飾超分子構造型IFN $\alpha$ は\*

\*血中において安定に保たれ、かつ肝臓への集積性において優れていた。

[0033]

[表1]

糖鎖修飾超分子構造型IFN $\alpha$ Aのラット静脈内投与後の血清内安定性と肝集積性

組織	投与後時間 (分)	濃度 (U/mlもしくはU/g)	
		IFN $\alpha$ A	超分子型IFN $\alpha$ A
血清	5	303 $\pm$ 48	419 $\pm$ 76
血清	10	138 $\pm$ 9.8	234 $\pm$ 28
肝臓	60	0.63 $\pm$ 0.12	0.93 $\pm$ 0.21

濃度は(平均 $\pm$ 標準偏差)で表した。

【0034】製剤例

本発明のサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体は、例えば、次のような処方によって製造することができる。

1. カプセル剤

(1) 実施例5で得たIL-2包埋体 10mg  
(2) ラクトース 90mg  
(3) 微結晶セルロース 70mg  
(4) ステアリン酸マグネシウム 10mg  
1カプセル 180mg  
(1)、(2)と(3)の全量及び(4)の1/2を混和した後、顆粒化する。これに残りの(4)を加えて全体をゼラチンカプセルに封入する。

2. 錠剤

(1) 実施例5で得たIL-2包埋体 10mg  
(2) ラクトース 35mg  
(3) コーンスターチ 150mg  
(4) 微結晶セルロース 30mg  
(5) ステアリン酸マグネシウム 5mg  
1錠 230mg  
(1)、(2)と(3)の全量及び(4)の2/3及び(5)の1/2を混和した後、顆粒化する。これに残りの(4)及び(5)をこの顆粒に加えて錠剤に加圧成型する。

【0035】3. 注射剤

(1) 実施例5で得たIL-2包埋体 2.5mg  
1アンプル 2.5mg  
(1)を全量2mlになるように注射用生理食塩液に溶かし、アンプルに封入する。全工程は無菌状態で行う。

4. カプセル剤

(1) 実施例4で得たIFN $\alpha$ 包埋体 10mg

(2) ラクトース 90mg

(3) 微結晶セルロース 70mg

(4) ステアリン酸マグネシウム 10mg

1カプセル 180mg

(1)、(2)と(3)の全量及び(4)の1/2を混和した後、顆粒化する。これに残りの(4)を加えて全体をゼラチンカプセルに封入する。

【0036】5. 錠剤

(1) 実施例4で得たIFN $\alpha$ 包埋体 10mg

(2) ラクトース 35mg

(3) コーンスターチ 150mg

(4) 微結晶セルロース 30mg

(5) ステアリン酸マグネシウム 5mg

1錠 230mg

(1)、(2)と(3)の全量及び(4)の2/3及び(5)の1/2を混和した後、顆粒化する。これに残りの(4)及び(5)をこの顆粒に加えて錠剤に加圧成型する。

6. 注射剤

(1) 実施例4で得たIFN $\alpha$ 包埋体 5mg

1アンプル 5mg

(1)を全量2mlになるように注射用生理食塩液に溶かし、アンプルに封入する。全工程は無菌状態で行う。

【0037】

【発明の効果】本発明のサイトカインを包埋させてなる超分子構造型集合体は、哺乳動物に投与されたとき、体内において安定に保たれ、かつ血中で該集合体からサイトカインが徐々に放出されるので、サイトカインの血中滞留時間を該薬物単独の場合より増大させることができ、また、速やかに標的臓器へ効率的に運搬されるので、低用量で治療効果をあげることができる。

【図面の簡単な説明】

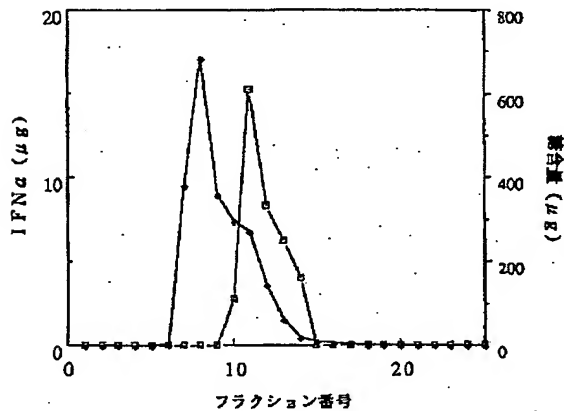
【図1】は実施例1で作製したプルラン-コレステロール誘導体および実施例2で作製したアミノエチルラクトース化プルランコレステロール誘導体の合成経路を示す。

【図2】は実施例1で作製したプルラン-コレステロール誘導体および実施例2で作製したアミノエチルラクトース化プルランコレステロール誘導体の合成経路を示す。

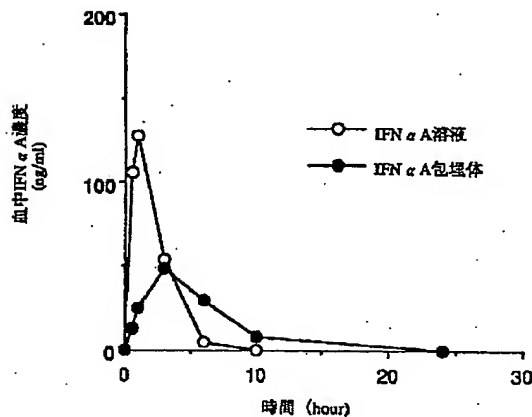
【図3】は糖鎖修飾プルラン-コレステロール誘導体および遊離型のIFN $\alpha$ のゲル濾過クロマトグラフィーの結果を示す。

【図4】は実施例6で作製したIFN $\alpha$ を包埋した糖鎖修飾プルラン-コレステロール誘導体（糖鎖修飾超分子構造型IFN $\alpha$ ）のゲル濾過クロマトグラフィーの結果

【図3】



【図5】



を示す。

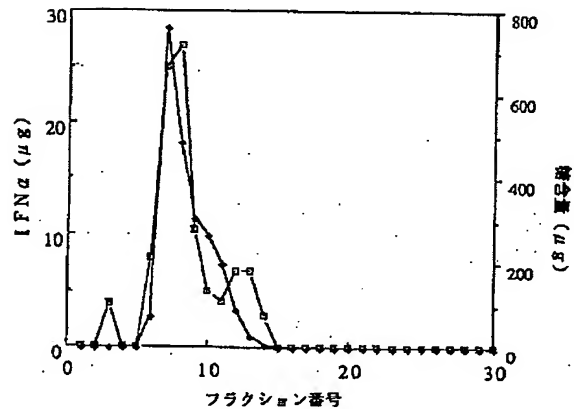
【図5】は実施例4で作製したIFN $\alpha$ /プルラン-コレステロール誘導体包埋体および遊離型のIFN $\alpha$ の皮下投与後の血中動態を示す。

【図6】は実施例5で作製したIL-2/プルラン-コレステロール誘導体包埋体および遊離型のIL-2の皮下投与後の血中動態を示す。

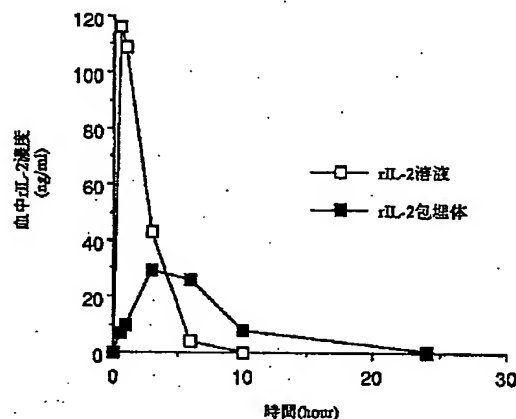
【符号の説明】

図3の□は、IFN $\alpha$ の結果を示す。図3および図4の◆は、糖鎖修飾プルラン-コレステロール誘導体の結果を示す。図4の□は、IFN $\alpha$ を包埋した糖鎖修飾プルラン-コレステロール誘導体の結果を示す。図5の○および●はそれぞれIFN $\alpha$  A溶液およびIFN $\alpha$  A包埋体を示す。図6の□および黒四角はそれぞれrIL-2溶液およびrIL-2包埋体を示す。

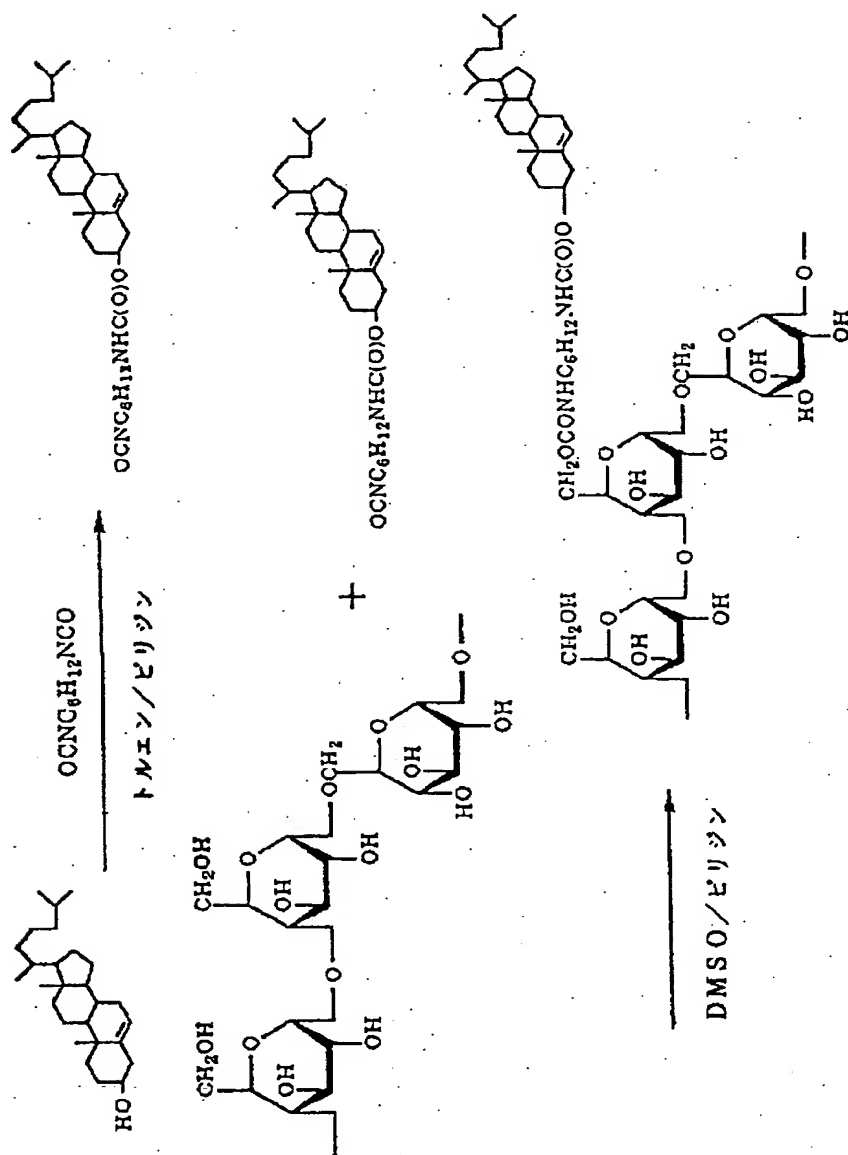
【図4】



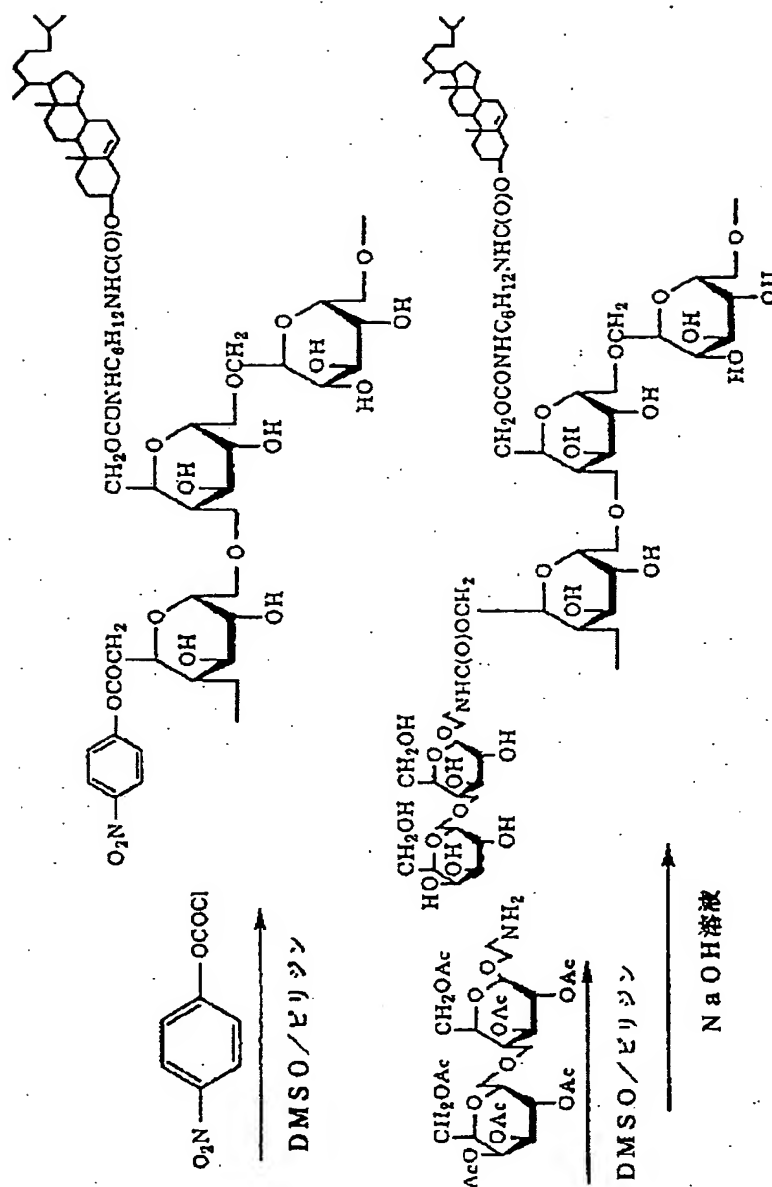
【図6】



【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

A 61 K 9/52

38/21

47/36

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

N

ADY

D

A 61 K 37/02

37/66

ADZ

ADY H